

神経芽腫培養細胞株GOTOが産生する免疫抑制因子

著者	矢尾板 誠一
号	2392
発行年	1992
URL	http://hdl.handle.net/10097/20690

氏 名（本籍） や お いた せい いち
矢 尾 板 誠 一

学 位 の 種 類 博 士 （ 医 学 ）

学 位 記 番 号 医 第 2 3 9 2 号

学位授与年月日 平 成 4 年 2 月 26 日

学位授与の条件 学位規則第4条第2項該当

最 終 学 歴 昭 和 57 年 3 月 25 日
東北大学医学部医学科卒業

学 位 論 文 題 目 神経芽腫培養細胞株 GOTO が産生する免疫抑
制因子

（主 査）

論 文 審 査 委 員 教授 大 井 龍 司 教授 今 野 多 助

教授 橘 武 彦

論 文 内 容 要 旨

腫瘍免疫を抑制する腫瘍は生体内で増殖可能であると考えられるが、事実、種々の癌細胞が何らかの因子を産生し宿主の腫瘍免疫を抑制していることが報告されている。一方、自然退縮が見られる神経芽腫の消長に宿主の免疫系が関与しているという有力な説があり、自然退縮しない進行例では神経芽腫が免疫抑制を行なっている可能性があると考えられた。

今回、神経芽腫培養細胞株を用いて免疫抑制活性が培養上清中に存在することを確認、その中でも神経芽腫培養細胞株 GOTO が産生する免疫抑制因子につき検討した。

実験に用いた GOTO 株は10% FCS 加 RPMI 1640 培地にて培養し、full sheet になったところで無血清培地に置き換えてさらに4日間培養した。この培養上清を採って限外濾過にて分子量5000以上を10倍に濃縮し、ゲル濾過にて部分精製を行い活性部分を採った。さらにこの分画を濃縮し、透析して陰イオン交換カラム Mono-Q にのせて PH 7.4 のリン酸緩衝液中で食塩濃度勾配により溶出した。

この因子の生物活性につき以下の実験を行った。①正常ヒト末梢単核球を刺激し増殖させた時の DNA 合成に対する抑制活性をトリチウムサイミジンの取込みを用いて測定した。また同様に培養細胞株の増殖に対する抑制活性を測定した。②抗 TGF β 抗体、抗 IAP 抗体でこの因子を処理し、抑制活性が中和されるかどうかを見た。またインドメタシンを GOTO 細胞の培養系に加え、抑制活性の出現に対する影響を見た。③正常ヒト末梢単核球を IL-2 とこの因子存在下に培養し、誘導される細胞障害活性を持った細胞 (LAK) の細胞障害活性を ^3Cr の放出を用いて測定し、この因子の LAK 細胞に対する影響を見た。④予め PWM にて刺激した末梢単核球 (PWM-blast) をこの因子にて処理し、表面抗原に対する影響をフローサイトメトリーを用いて解析した。また同様に培養細胞株の表面抗原発現に対するこの因子の影響を見た。⑤ PWM-blast をこの因子にて処理し、PI にて DNA を染色して細胞周期に対する影響を解析した。⑥正常ヒト末梢単核球をマイトージェンにて刺激する際にこの因子にて処理し、上清に故出される TNF 活性を測定して TNF 産生に対する抑制活性を見た。TNF 活性はアクチノマイシン D 存在下での LM 細胞に対する障害活性にて求めた。

以上の実験より、神経芽腫培養細胞株 GOTO が産生する免疫抑制因子につき以下の結論を得た。①神経芽腫培養細胞株 GOTO は培養上清中に、透析では抜けず、ゲル濾過では分子量約4万、陰イオン交換カラム Mono-Q では PH 7.4 のリン酸緩衝液中で 0.4M NaCl に溶出される免疫抑制因子を産生する。この因子は既知の免疫抑制因子 (TGF β , IAP, PG) とは異なる。②この因子は種々の刺激によるリンパ球の増殖を抑制するだけでなく、細胞障害活性をもった LAK 細

胞の誘導も抑制する。③この因子は HLA-DR や IL-2 リセプターの発現は抑制しない。④この因子はリンパ球の DNA 合成を抑制すると考えられ、細胞周期の S 期に集積させる。⑤この因子は末梢単核球がマイトジェン刺激にて TNF を産生するのを抑制する。また進行神経芽腫患児血清中にも、TNF 産生を抑制し、リンパ球の増殖を抑制する活性が見いだされた。

TNF は腫瘍細胞など特定の細胞に対して細胞障害活性を有する物質として知られているが、また生体防御反応の調節因子として重要な役割を演じていると考えられている。神経芽腫が TNF 産生を抑制する物質を産生することは、TNF による神経芽腫の壊死を防ぎ、また宿主の免疫系を攪乱、抑制して、神経芽腫の増殖に有利に作用すると考えられた。さらにリンパ球の DNA 合成も強く阻害し、LAK 細胞の出現も抑制することにより、この免疫抑制因子の存在下では腫瘍細胞を傷害するキラーは誘導されないと考えられた。宿主の細胞性免疫を抑制することにより神経芽腫が排除されることを防ぎ、増殖を可能にすると考えられた。

進行神経芽腫の治療にあたっては、このような免疫抑制因子が神経芽腫によって産生されている可能性を念頭において、化学療法、手術療法、免疫療法などを組み合わせる必要がある。

審 査 結 果 の 要 旨

進行神経芽腫は集学的治療を行っても再発が多く予後は不良で、新しい治療を導入する必要がある。免疫療法も試みられているが、有効性は今の所不明である。神経芽腫は自然退縮する病型が知られているが、進行神経芽腫と免疫系のかかわりは明確ではない。本研究は神経芽腫が宿主の免疫系に与える影響の一つとして免疫抑制物質の産生に注目し、培養細胞株を用いてその基礎的研究を行ったものである。

著者は、まず、神経芽腫培養細胞株を用いて免疫抑制活性が培養上清中に存在することを確かめ、その中でも神経芽腫培養細胞株 GOTO が産生する免疫抑制因子につき検討した。

GOTO 株は10%FCS 加 RPMI 1640培地にて培養し、full sheet になったところで無血清培地に置き換え、この培養上清を採って限外濾過にて分子量5000以上を10倍に濃縮し、ゲル濾過にて部分精製を行い活性部分を採った。さらにこの分画を10倍に濃縮し、透析して陰イオン交換カラム Mono-Q にのせて PH7.4のリン酸緩衝液中で食塩濃度勾配により溶出した。この因子の生物活性につき実験を行い、以下の結論を得た。①神経芽腫培養細胞株 GOTO は培養上清中に、透析では抜けずゲル濾過では分子量約4万、陰イオン交換カラム Mono-Q では PH7.4のリン酸緩衝液中で0.4M NaCl にて溶出されるリンパ球増殖抑制因子を産生する。この因子は既知の免疫抑制因子 (TGF β , IAP, PG) とは異なる。②この因子は種々の刺激によるリンパ球の増殖を抑制するだけでなく、細胞障害活性を持った LAK 細胞の誘導も抑制する。③この因子は HLA-DR や IL2リセプターの発現は抑制しない。④この因子はリンパ球の DNA 合成を抑制し、細胞周期の S 期に蓄積させる。⑤この因子は末梢単核球がマイトージェン刺激にて TNF を産生するのを抑制する。

さらに進行神経芽腫患児血清にも TNF 産生を抑制し、リンパ球の増殖を抑制する活性がある。

これらの結果から著者は、この神経芽腫 GOTO が産生する免疫抑制物質の細かい性状は今の所不明であり、今後さらに精製を行い臨床例でも検討を加えることが必要であるが、この因子は既知の免疫抑制因子とは異なる物質で、リンパ球の DNA 合成を阻害し、細胞障害活性を持った細胞の出現も抑制し、また TNF の産生をも抑制すると結論している。加えて進行神経芽腫患児の血清にも同様の活性があると述べている。

以上本論文は、神経芽腫がこのような免疫抑制因子を産生して宿主の腫瘍免疫を抑制している可能性を示し、神経芽腫の治療の発展に寄与するところが大きいと考えられるので学位論文に値するものである。